

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物の特徴の現れる部位の明るさおよび、または色を数値化し、これに統計的手法を用いて得られた数値と比較して、微生物の集落数および、または菌種判定を行うことを特徴とする微生物の判定方法。

【請求項2】 光散乱板と照明からなる光源と、検体から受光し、撮像する装置とそれに関連するコンピュータ機器からなる装置により構成されたことを特徴とする請求項1記載の微生物の判定装置。

【請求項3】 培地を設置しない状態で撮像した画像から作成した補正值により、背景となる培地の明るさ、色のむらを補正することを特徴とする請求項1記載の微生物の判定方法。

【請求項4】 請求項1記載の微生物の判定方法に用いるコンピュータプログラムのデータベース。

【請求項5】 請求項4記載のデータベースに、微生物の遺伝子情報を付属させたことを特徴とするデータベース。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、微生物の集落の明るさ、色による微生物の判定方法およびその装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】微生物などの検出、評価において最も信頼性の高いと云われるのは培養法であるが、この培養には多くの培地について、24時間以上の時間を必要とし、また微生物の計数や種類の判定にあたっては、測定者に相応の経験が要求される。一方、微正物管理については、培養時間の短時間化、測定者の個人的能力によらない測定が必要となっている。本件出願人はこれらに関する技術として、先に「微生物などの検査方法およびその装置」として、特願平10-36827号（特開平11-221070号）、特願平10-334931号（特開2000-139445号）の出願をなしているが、この発明はさらにそれらの発展にかかるものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、培地に育成した細菌や微生物などのコロニー（集落）を計数し、またそれらの種類の判別を行う方法およびその装置であり、前記コロニーあるいはその周辺培地の明るさ、色をコンピュータ処理により数値化し、統計的処理することによって、微生物の特徴を抽出し、通常の培養時間、または短時間培養で、計数と種類の判別を行うことを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】この発明は、光散乱板と照明からなる光源と、検体（シャーレなど）を透過し、あるいは検体で反射した光、あるいはそれらの双方を用

いて受光し、撮像する装置とそれに関連するコンピュータ機器からなる装置により構成される。この発明では、まず前記検体を設置しない状態で撮像を行い、装置特有の“むら”（ばらつき）を記録し、“むら”を軽減させるための補正值を得る。つぎに検体を撮像した結果、得られる画像に、検体の種類に応じた補正值と、装置特有の“むら”から算出される補正值により補正を実施し、“むら”の少ない検体画像を得、この検体画像から対象とする微生物の特徴を得る。それはコロニーの画像の中央部、あるいは周辺部、あるいは周辺培地から微生物特徴を示す部位の画素を抽出し、その明るさ、色を数値化し、統計的処理を実施する。その結果、微生物の特徴を示す明るさ、色の数値範囲や、目標とする対象の微生物にどれだけ近い特徴を備えているかを算出する数式を求める。

【0005】すなわち、検査対象の検体画像について“むら”補正を施し、微生物特徴を示す明るさ、色の数値範囲に該当する画素を抽出する。その結果、コロニー部または微生物により変色などの特徴が見られる部位の画素が抽出される。ここでコロニーとして抽出した画素は、たとえば中央部など、より特徴を示す部位の明るさ、色の数値を評価し、該当する微生物の判定を行う。これにより目視により判定が困難、あるいは手数を要するコロニーの計数、微生物種類の判定を行うことが可能となる。また抽出した画素の数により、目標とする微生物の存在を評価、判定することができる。さらにこの発明により、短時間培養で発現する微生物量と、通常（正規）培養時間で発現する微生物量との差異、相関などで、成長量の評価を得ることができる。

【0006】

【発明の実施の形態】以下図面にしたがってこの発明の方法と装置について述べる。図1はこの発明の装置の概略を示し、各部とその構成は図示に記述するとおり撮像部と、それに関連するコンピュータ機器とからなっている。ここでその照明光源（1）には白色LED、撮像装置（2）にはCCDカメラを用い、画像はRGB（256階調）で取り扱う。しかし波長域が異なる複数の光による画像であれば、これに限定するものでない。その他、モノクロームカメラと光学的フィルターによる画像、モノクロームカメラと複数の光源による画像、撮像装置（2）にライセンサを用いること、照明光源（1）にオレンジ色を追加したり、または差し替えることなど様々な組み合わせを行ってもよい。まず検体〔シャーレ〕（3）を設置しない状態で撮像し、画像周辺部が暗くなるなどの装置固有の“むら”が出るが、この画像データから補正值を作成する。つぎに検体（3）は培地の種類ごとに様々な色や濃さを呈しているの、培地の種類に応じて照明光源（1）の光量を設定する。また前記“むら”の補正に乗ずる数値を透過率、反射率、または実際に蓄積したデータにより予め設定しておく。

【0007】図2は検体(3)の撮像画像(3')であり、多数のコロニー(c)が撮影されているのが見られる。図3は図2のA-A'線において、線上の画素を縦軸輝度(明るさ)で示したグラフであり、図4は図3において前述の“むら”補正後のグラフであり、前述の検体(3)の画像周辺になるにしたがい、暗くなっていた画像を、補正により、培地についてほぼ均一の輝度としたものである。さらに画像のノイズを除去するには、中間値フィルタなどを用いる画像処理、あるいは複数回の撮像によるそれらの平均などによる処理などが有効である。

【0008】つぎに微生物の特徴を示す画像を選択、抽出することについて述べる。多くの場合、微生物などのコロニーの中央部がその特徴を示すのであるが、コロニーの外輪部に顕著な特徴があればそれも併せてその部分の画素を抽出する。培地の種類とその使用目的によっては、コロニーではなく、培地そのものの変色が評価対象となるので、その際には変色部分の画素を抽出する。コロニーの中央部を選択するにあたっては、たとえばコロニー形状の重心、距離などから抽出するとか、コロニーの最も暗い画素を一つ以上抽出して平均することが手段としてよい。抽出した画素情報について統計的処理を施し、その微生物の画像から、明るさおよび色についての特徴を数値化する。以下の記述はコロニー最暗部をその特徴とした例によって説明することとする。

【0009】この発明では明るさはRGB各成分の輝度値、色はそのRGB輝度値の除算、減算などの演算により、明るさの影響を受けにくい数値を用いる。すなわち、明るさとしてRGB輝度値、色として $(G+B)/2-R$ 、 $(B+R)/2-G$ 、 $(R+G)/2-B$ による演算結果を用いるが、統計処理可能な数値へ変換できるものであれば、明るさを周波数とその振幅で表現したり、色を色彩、色相をはじめとする演算値としたりしてもよい。図5は一例としてクロモアガーECC上の大腸菌および大腸菌群(10時間培養)の明るさの数値のヒストグラム、図6は同じく色の数値のヒストグラムであり、その分布に差異が顕著に現れていることが分かる。

【0010】これらのヒストグラムから各微生物の数値について上限値、下限値を定め、前述の検体画像からその培地に発育し得る微生物の数値に該当する画素を抽出する。ここで抽出された画素はコロニーとほぼ一致しており、集落を形成している。ひとまとまりとなった画素のさらに最暗部を抽出し、その数値について評価する。

図7はクロモアガーECC上の大腸菌および大腸菌群

(10時間培養)について、ヒストグラムの度数から複数の上限、下限値による範囲より判定した結果と、平均値と標準偏差から、どちらの菌に近い次式により判定した結果を示す。 $MC = \sum \{ (Bi - Mbi)^2 / \sigma bi^2 \} + \sum \{ (Ci - Mci)^2 / \sigma ci^2 \}$ 、ここでMC: 目標微生物“らしさ”を表す数値、小さいほど目

標微生物の平均的な明るさ、色に近い、 $Bi: R, G, B$ の、各輝度値などの明るさを表す検体から得られる数値、 Mbi : データベースから統計の結果、得られた Bi の平均値、 σbi : データベースから統計の結果、得られた Bi の標準偏差、 $Ci: (G+B)/2-R$ 、 $(B+R)/2-G$ 、 $(R+G)/2-B$ の各輝度値などの色を表す検体から得られる数値、 Mci : データベースから統計の結果、得られた Ci の平均値、 σci : データベースから統計の結果、得られた Ci の標準偏差である。そしてそれぞれの判定を単独また併用し、微生物のコロニーと判断される画素のまとまりの数を、コロニーとして計数し、微生物の種類を判定を行う。

【0011】培地上の塵埃やシャーレの印字などが存在する場合、一部の画素は、対象となるコロニーと、ほぼ同様の分布を示す画素となることがある。その際には、意図的にこれらのノイズが抽出されるように、一旦、対象範囲を拡げて、最暗部を判定評価することで、ノイズを除去することができる。ここで判定率の正答率は培地と微生物の組み合わせ、さらに培養時間との組み合わせにより異なる。疑惑数として表記することも一つの手段であるが、正答率が予め分かれば数学的(連立方程式により)に容易に補正することができる。図8はクロモアガーECC上の大腸菌および大腸菌群の10時間培養結果について、補正を実施した例を示す。

【0012】平均値・標準偏差による判定を実施すると、図7より大腸菌の正答率は89.5%、大腸菌群の正答率は92.5%である。この値をたとえば図8のシャーレ番号M_01に適用すると判定結果は、大腸菌41個、大腸菌群は29個であるが、それぞれ誤認されたコロニーを含む。前記M_01の大腸菌数をE個、大腸菌群をC個とすると各正答率により、 $E \times 0.895 + C \times (1 - 0.925) = 41$ と $E \times (1 - 0.895) + C \times 0.925 = 29$ の連立方程式を立てることができる。この結果、 $E = 43.6$ 、 $C = 26.4$ となる。これらを整数として表記すると $E = 44$ 、 $C = 26$ であり、実際にシャーレ上に育成するコロニー数(大腸菌45個、大腸菌群25個)に近い数字となっている。正答率を固定すると算出した結果のコロニー数が対象数と異なる場合が生じるが、算出結果の割合に応じ、コロニー数を修正すればよく、疑惑数がある場合、対象微生物が三種以上ある場合でも、前述の手段により、補正することができる。一般に培養時間が短いほど正答率は低下するが、この手段により判定の精度を向上することができる。

【0013】この発明によれば、従来目視のために困難であった培養時間の違いによる成長量や、(見かけ上の)コロニー数の変化を定量的に評価することができる。通常、この種の計測装置には一定の精度が要求されるが、この発明では画素の判定に際し、統計的手法による数値を使用しているため、必要により標本検体の撮像

10

20

30

40

50

画像から容易に補正值を求め、判定用のデータに反映し、校正、標準化することができる。この発明によればコロニーとその種類の判定だけでなく、培地の変色などの変化を表現することができる。ここに述べた実施例では対象領域は画素にして約10万個であるが、前述の手法によれば効率よく微生物の特徴を示す画素を表示することができる。そして各培地、微生物の種類、培養時間に応じたコロニー平均画素数をデータとして用意し、コロニーが密集したため計数が困難な場合でも、抽出画素数÷コロニー平均画素数により、計数結果を補正することができる。またコロニーそのものよりも、ハローを含む周囲の変色部がより重要となる検査については、この変色部の画素を微生物特徴として用い、画素数から定量的に表現することができる。逆に変色の無い部分を定量的に評価し、微生物を評価することもできる。

【0014】なお微生物の遺伝子情報〔遺伝子増幅（PCR）法：ランダムPCR（RAPD）法、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法〕を第2データとする。この第2データとして含まれるものを例示すると、（1）通常の培養法、（2）酵素抗体（EIA）法、（3）免疫磁気ビーズ法などがあり、それらの手法で得た微生物の特徴を数値化したデータを、それぞれ、または幾つかを用いる。この発明では、この微生物の遺伝子情報を、そのデータベースに、第2データとして付属させて用いることによって、微生物の判定の精度を一段と向上させることができる。

* 【0015】

【発明の効果】この発明によれば、通常に必要とする培養時間よりも短時間の培養であっても、コロニー計数が可能であり、また通常の培養を実施した場合のコロニー数の予測をすることができる。また前述の変色部の定量的評価、およびその微生物の判定を行うことができる。この発明はデータベースとの照合だけではなく、統計処理により得られる数値の比較、または演算結果などで微生物の判定ができるため、判定に要する時間を短縮することができる。なおこの発明の装置はその用途に応じ、随意、低価格化を図ることもできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の装置の概略を示す図。

【図2】検体撮像画像の一例を示す図。

【図3】図2のA-A'線上の輝度を表すグラフ図。

【図4】図3の補正グラフ図。

【図5】検体の画像の明るさのヒストグラム図。

【図6】検体の画像の色のヒストグラム図。

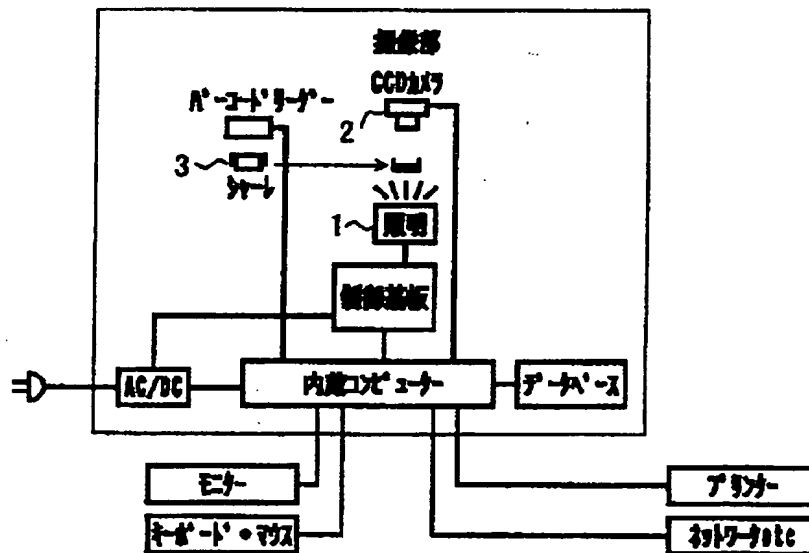
【図7】検体の判定結果を示す図表を示す図。

【図8】図7の補正結果を示す図表を示す図。

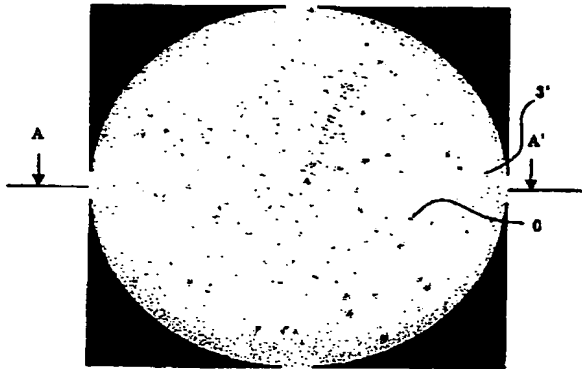
【符号の説明】

- （1） 照明光源
- （2） 撮像装置
- （3） シャーレ
- （3'） 撮像画像
- （c） コロニー

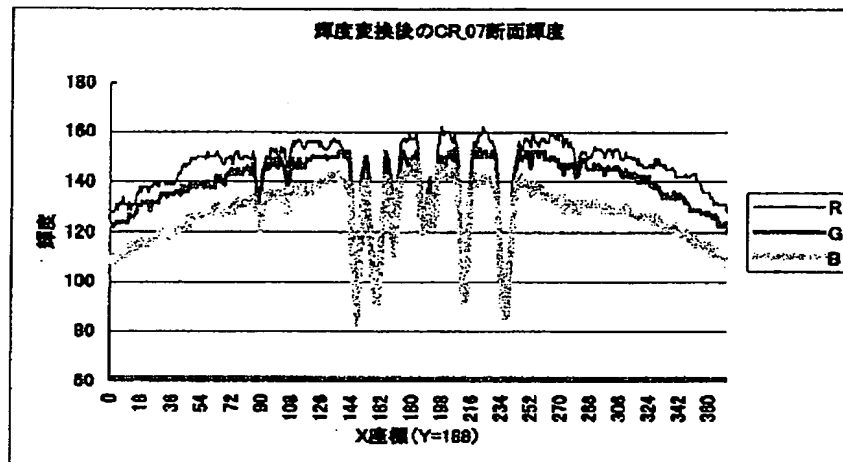
【図1】



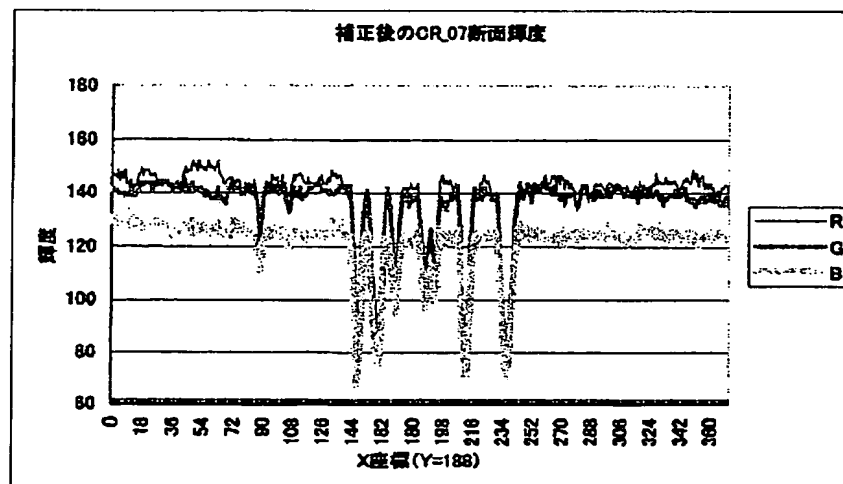
【図2】



【図3】



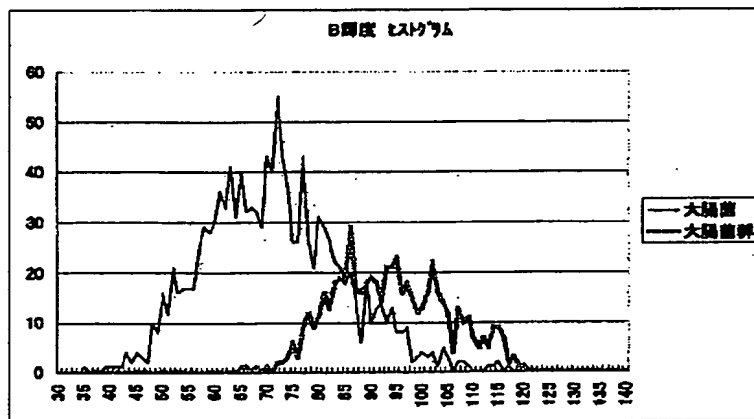
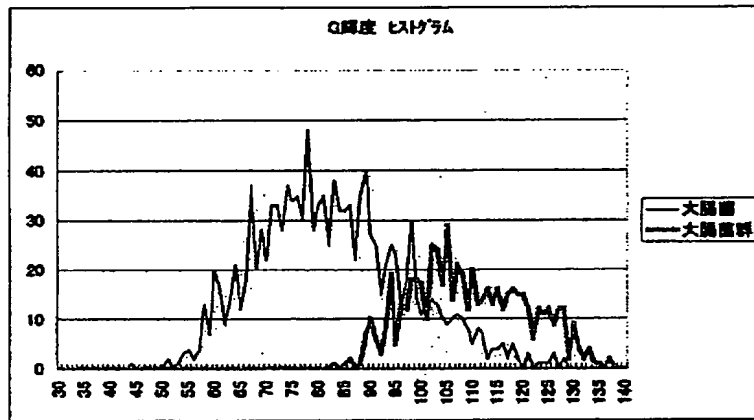
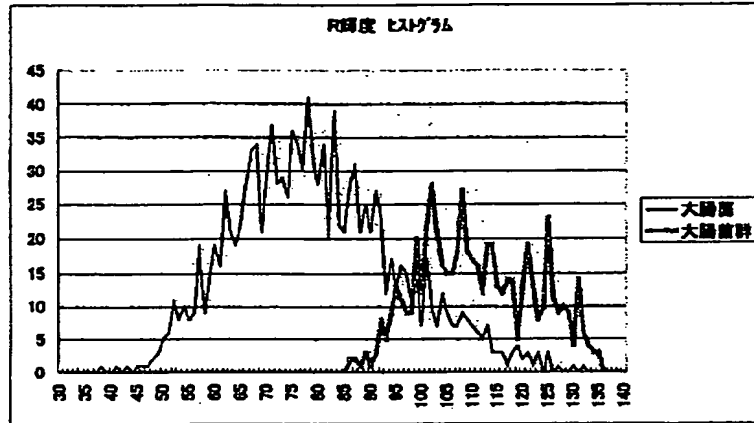
【図4】



BEST AVAILABLE COPY

【図5】

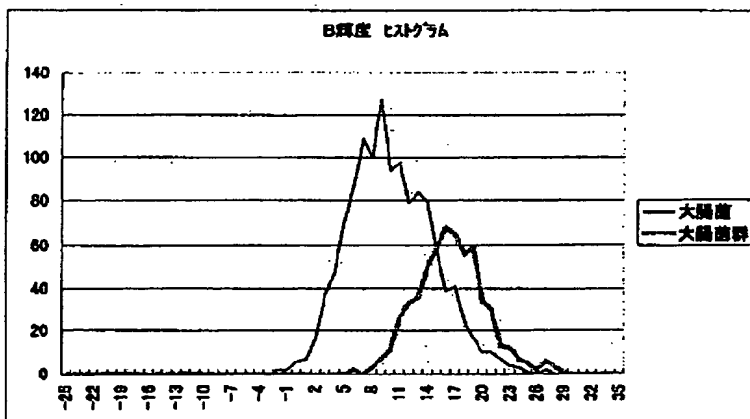
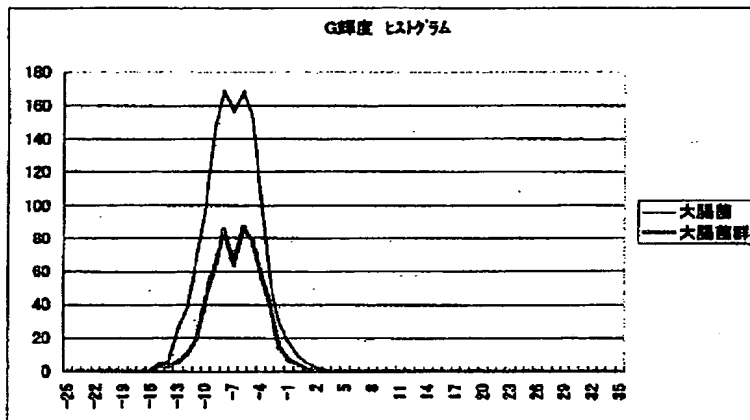
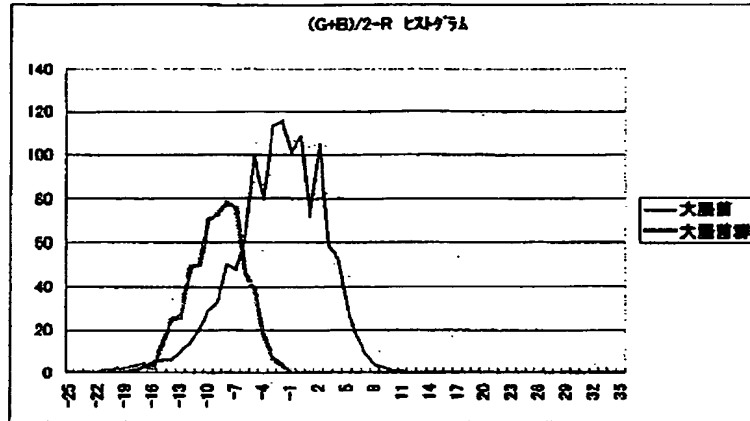
明るさのヒストグラム



BEST AVAILABLE COPY

【図6】

色のヒストグラム



BEST AVAILABLE COPY

【図7】

大腸菌のみ播種

シール番号	対象菌数	ヒストグラムによる判定			平均値・標準偏差による判定		
		E	C	G	E	C	G
E_01	39	35	1	3	38	1	0
E_02	45	29	5	11	39	6	0
E_03	45	35	2	8	40	5	0
E_04	49	39	3	7	45	4	0
E_05	30	28	2	0	28	2	0
E_06	31	26	2	3	29	2	0
E_07	44	37	3	4	43	1	0
E_08	32	13	11	8	20	12	0
合計	315	242	29	44	282	33	0
		76.8%	9.2%	14.0%	89.5%	10.5%	0.0%

大腸菌群のみ播種

シール番号	対象菌数	ヒストグラムによる判定			平均値・標準偏差による判定		
		E	C	G	E	C	G
C_01	42	1	34	7	4	38	0
C_02	25	0	17	8	2	23	0
C_03	20	0	17	3	1	19	0
C_04	7	0	5	2	1	6	0
C_05	14	0	11	3	1	13	0
C_06	18	0	12	6	0	18	0
C_07	13	0	10	3	2	11	0
C_08	7	0	5	2	0	7	0
合計	146	1	111	34	11	135	0
		0.7%	76.0%	23.3%	7.5%	92.5%	0.0%

加モリガ-BCCにおける菌種判定方法による相違

データ： 単菌塗抹播種、10時間培養

ヒストグラムによる判定：明るさ、色の上限值・下限値の範囲を比較

平均値・標準偏差による判定：MC算出結果を比較

E：大腸菌 C：大腸菌群 G：疑惑

【図8】

シール番号	菌種	対象数	判定結果	正答率による 補正判定結果
M_01	大腸菌	45	41	44
	大腸菌群	25	29	26
M_02	大腸菌	45	41	44
	大腸菌群	20	24	21

フロントページの続き

(72) 発明者 太田 佳志

神奈川県横浜市中区伊勢佐木町7丁目152

番地サンヴェール伊勢佐木町601号室

Fターム(参考) 2G045 AA28 BB20 CB21 FA11 GC22
JA01
4B029 AA07 BB01 CC07 FA03 FA04
GB06
4B063 QA18 QQ05 QQ43 QS39 QX01
QX04
5C054 AA01 EA05 EE08 FC15 FC16
HA05